

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 30520081152699

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

雷公藤甲素作用于 tRXR 靶点的抗癌机制

The Anticancer Mechanism of Triptolide Targeting tRXR

陆娜

指导教师姓名: 曾锦章教授

张晓坤教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩日期: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

# 目 录

摘 要 .....	1
Abstract .....	2
第一章 前言 .....	3
1. 核受体简介 .....	3
2. 视黄醇 X 受体 .....	4
2.1 视黄醇 X 受体的结构 .....	4
2.2 视黄醇 X 受体的基因型功能 .....	5
2.3 视黄醇 X 受体的非基因型功能 .....	6
2.4 视黄醇 X 受体与肿瘤 .....	7
3. PI3K/ AKT 信号通路 .....	8
3.1 PI3K 的结构和分类 .....	9
3.2 AKT 的结构和分类 .....	9
3.3 PI3K/ AKT 信号通路途径及其调控 .....	9
4. p38MAPK 信号通路 .....	10
5. 雷公藤与肿瘤 .....	12
第二章 材料与amp;方法 .....	16
1. 实验材料 .....	16
1.1 细胞株、菌株及质粒 .....	16
1.2 主要试剂 .....	16
1.3 主要仪器 .....	17
1.4 主要溶液 .....	18
2. 实验方法 .....	22
2.1 细胞培养与冻存 .....	22
2.2 MTT 实验测定细胞生长抑制 .....	23
2.3 细胞转染 .....	23

2.4 蛋白提取与 Western Blots .....	24
2.5 免疫荧光染色和观察.....	26
2.6 免疫共沉淀 (CO-IP) .....	26
2.7 RNA 干扰技术 .....	27
2.8 肝癌裸鼠移植瘤模型.....	27
2.9 统计学分析.....	28
2.10 TdT 酶介导的原位缺口标记(TUNEL)法 .....	28
2.11 受体配体结合法研究雷公藤甲素对 RXR $\alpha$ 配体受体竞争结合的影响 .....	29
<b>第三章 实验结果与分析 .....</b>	<b>30</b>
1.雷公藤甲素能在细胞水平上诱导癌细胞凋亡的同时, 减少 tRXR 的表达...30	
2.雷公藤甲素能在动物水平上抑制肿瘤的生长和减少 tRXR 的表达.....32	
3.雷公藤甲素的凋亡作用依赖于 tRXR 的表达.....34	
4. 雷公藤甲素通过 tRXR 抑制 AKT 的激活.....35	
5. 雷公藤甲素能抑制 TNF $\alpha$ 诱导的 P-AKT .....	37
6. 雷公藤甲素能抑制 tRXR 与 p85 间的相互作用 .....	38
7. 雷公藤甲素能增强 TNF $\alpha$ 的死亡受体途径.....39	
8. 雷公藤甲素能与其他抗癌药物发挥协同凋亡作用.....40	
9.雷公藤甲素不能和 RXR 结合 .....	41
10.p38 的激活参与了雷公藤甲素通过 tRXR 抑制 AKT 的激活作用.....42	
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>45</b>
<b>第五章 结论 .....</b>	<b>48</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>49</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>55</b>

## Table of Contents

<b>Abstract In Chinese .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Chapter I Preface .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduction of Nuclear Reporter .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Retinoid X Receptor (RXR).....</b>	<b>4</b>
2.1 Structure of RXR .....	4
2.2 Genomic function of RXR .....	5
2.3 Nongenomic function of RXR .....	6
2.4 RXR and cancer .....	7
<b>3. PI3K/AKT Signal Pathway .....</b>	<b>8</b>
3.1 Structure and classification of PI3K .....	9
3.2 Structure and classification of AKT .....	9
3.3 Regulation of PI3K/ AKT .....	9
<b>4. p38MAPK Signal Pathway.....</b>	<b>10</b>
<b>5.Triptolide and Cancer .....</b>	<b>12</b>
<b>Chapter II Materials and Methods .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Materials .....</b>	<b>16</b>
1.1 Cell lines, strain and plasmid .....	16
1.2 Reagents .....	16
1.3 Apparatus .....	17
1.4 Solution .....	18
<b>2. Methods .....</b>	<b>22</b>
2.1 Cell culture and storage .....	22
2.2 The growth inhibition measuring with MTT .....	23
2.3 Cell transfection .....	23
2.4 Protein extraction and Western Blotting .....	24

2.5 Immunofluorescence .....	26
2.6 Immunoprecipitation(CO-IP).....	26
2.7 RNA interference technology .....	27
2.8 Hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice .....	27
2.9 Statistical analysis .....	28
2.10 TUNEL assay .....	28
2.11Competitive ligand binding assay .....	29
<b>Chapter III Results and Analysis .....</b>	<b>30</b>
1. Triptolide induces apoptosis and reduces expression of tRXR in cancer cells .....	30
2. Triptolide inhibits the growth of tumor and reduces expression of tRXR in animal level .....	32
3. The apoptotic effect of triptolide is dependent on tRXR expression .....	34
4. Triptolide inactivates AKT activity through mediation of tRXR.....	35
5. Triptolide could inhibit AKT activity induced by TNF $\alpha$ .....	37
6. Triptolide could inhibit the interaction between tRXR and p85.....	38
7. Triptolide could activate the death signaling of TNF $\alpha$ .....	39
8. Triptolide has synergistic effect in apoptosis with other chemotherapies ...	40
9. Triptolide can not bind to RXR.....	41
10. Activation of p38 involves in inactivation of AKT through mediation of tRXR .....	42
<b>ChapterIV Discussion .....</b>	<b>45</b>
<b>Chapter V Conclusion .....</b>	<b>48</b>
<b>References .....</b>	<b>49</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>55</b>

## 英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
NR	nuclear receptor	核受体
AR	androgen receptor	雄激素受体
PR	progesterone receptor	孕激素受体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
MR	mineralocorticoid receptor	盐皮质激素受体
RXR	retinoid X receptor	视黄素 X 受体
RAR	retinoic acid receptor	视黄酸受体
tRXR	N-terminally-truncated RXR $\alpha$	RXR $\alpha$ 的 N 端切割小片段
TR	thyroid hormone receptor	甲状腺激素受体
VDR	vitamin D receptor	维他命 D3 受体
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶激活受体
DBD	DNA-binding domain	DNA 结合结构域
LBD	ligand-binding domain	配体结合区
AF	Activation function,	转录激活功能域
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbecco's 的改良 Eagle's 培养基
ATRA	All-trans-retinoic acid	全反式视黄酸
9-cis-RA	9-cis retinoic acid	9-顺视黄酸
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子
Cyt c	Cytochrome c	细胞色素 c
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3	类胰岛素生长因子结合蛋白-3
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B	
I $\kappa$ B	inhibitory protein of NF- $\kappa$ B	
BH	Bcl - 2 homology domain	Bcl - 2 同源结构域
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor	表皮生长因子受体
PTK	Protein Tyrosine Kinase	蛋白质酪氨酸激酶
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor	肿瘤坏死因子受体
TRAP-1	Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1	肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1
NBS	Nonspecific binding	非特异性结合
HSP70	Heat Shock Protein 70	热激蛋白 70
LMB	Leptomycin B	普霉素 A
PKA	Protein Kinase A	蛋白激酶 A
PKC	Protein Kinase C	蛋白激酶 C
MAPK	Mitogen - Activated Protein Kinase	促分裂原活化蛋白激酶
HBx	Hepatitis B Virus X Protein	乙型肝炎 X 蛋白
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子
EBNA2	Epstein - Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 2	爱泼斯坦-巴尔病毒细胞核抗原



## 英文缩略词

EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
IKK	I $\kappa$ B kinase	
p38	mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶
JNK	c-Jun N-terminal kinases	c-Jun 氨基末端激酶
ERK2	Mitogen-activated protein kinase 2	细胞外信号调节激酶 2
PARP	poly ADP-ribose polymerase	聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase	
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$	糖原合成酶激酶-3 $\beta$
CDK	Cyclin-dependent kinase	周期蛋白依赖性激酶
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	雷帕霉素靶蛋白
NSAID	Non-Steroidal anti-Inflammatory drugs	非类固醇类消炎止痛药
COXs	Cyclooxygenases	环氧化酶
PGE2	Prostaglandin E2	前列腺素 E2
PIP2	phosphatidylinositol 4 , 5 biphosphate	
PIP	phosphatidylinositol 4 phosphate	
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液

## 摘 要

雷公藤甲素，是传统中药雷公藤有效成分，在中国已被广泛应用于临床治疗炎症和癌症，其细胞毒性的机理还不清楚。RXR 作为核受体超家族的重要成员，在细胞生长和凋亡调控中具有重要作用，是一个有效的抗癌靶点。在这里我们报道雷公藤甲素能通过触发 RXR 的非基因功能来发挥凋亡作用的。在癌症中，由 RXR $\alpha$  切割形成的 tRXR 能在几种肿瘤和癌细胞中高度表达，并且能增强生长信号通路。我们发现雷公藤甲素能在各种癌症细胞中发挥凋亡作用，这与细胞内 tRXR 表达量的减少有关。雷公藤甲素能对表达 tRXR 的细胞包括 7703 肝癌细胞，MCF-7 乳腺癌细胞和 Hela 宫颈癌细胞产生凋亡作用，而在不表达 tRXR 的 SW480 细胞和 293T 细胞在同样的处理下则产生的凋亡作用很弱。当转染 RXR $\alpha$ /Δ80，RXR N 端缺失 80 个氨基酸，和内源 tRXR 有相同分子量的突变体能提高雷公藤甲素在 SW480，293T 细胞以及 MCF-7 细胞中的凋亡作用。相反，雷公藤甲素的凋亡作用能被 tRXR 的干扰所抑制。在我们的努力下，我们揭示了雷公藤甲素抗癌的分子机制，我们发现雷公藤甲素能强烈抑制 tRXR 与 p85 的相互作用，从而抑制 AKT 的活性。雷公藤甲素能通过蛋白酶体介导的降解途径降解 tRXR。然而，我们发现雷公藤甲素不能和 RXR 配体结合域（LBD）结合。雷公藤甲素对肿瘤细胞的生长抑制和 tRXR 激活 AKT 活性的拮抗作用是依赖于 p38 的活化的。雷公藤甲素诱导的 AKT 磷酸化与 p38 的磷酸化密切相关。我们的研究结果表明，雷公藤甲素能通过 p38 介导的依赖 tRXR 的 AKT 信号通路发挥凋亡作用。探究雷公藤甲素的分子机理对提高其抗肿瘤的选择性，减少先导化合物非特异性毒性有很大的帮助。

**关键词：**雷公藤甲素；tRXR $\alpha$ ；凋亡

## Abstract

Triptolide, an active component of traditional Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F, which has been widely used in clinic in China to treat inflammatory and cancerous diseases, is a very potent cytotoxic agent with unknown mechanism of action. Retinoid X receptor- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), a key member of the nuclear receptor superfamily, plays important role in regulation of cell growth and apoptosis and is known as an effective anticancer target. We reported here that the apoptotic effect of triptolide in cancer cells could be triggered through modulation of the non-genomic activity of RXR $\alpha$ . During carcinogenesis, the increased non-genomic growth signaling of RXR was mainly achieved by its N-terminally truncated form tRXR which was highly detectable in several tumors and cancer cells. We found that triptolide exerted different apoptotic effects in various cancer cells, which was closely associated with intracellular tRXR expression. Triptolide was potent for apoptotic induction in tRXR-expressed cells including 7703 liver cancer cells, MCF-7 breast cancer cells and Hela cervical cancer cells, while the cells lacking tRXR such as SW480 colon cancer cells and 293T cells appeared to be resistant to the same treatment. Transfection of RXR $\alpha$  /  $\Delta$ 80, a RXR mutant lacking its N-terminally 80 amino acids with a molecular weight similar to the endogenous tRXR, could reconstitute the apoptotic response of triptolide in SW480 cancer cells and 293T cells, and significantly enhance the apoptosis-including effect of triptolide in MCF-7 cancer cells. In contrast, the apoptotic action of triptolide was greatly impaired by siRNA-mediated tRXR inhibition. In our effort to disclose the potential molecular mechanism, we found that triptolide could strongly inhibit tRXR-dependent AKT activity due to its disruption of tRXR interaction with p85 $\alpha$ . Consistently, triptolide could potentially induce tRXR degradation through proteasome-mediated pathway. However, we failed to find that triptolide could bind to RXR ligand binding domain (LBD). Rather, the antagonistic effects of triptolide on cancer cell growth and tRXR-driven AKT activity were dependent on its activation of p38. Triptolide-induced AKT phosphorylation was closely associated with elevated p38 phosphorylation. Together, our findings demonstrate that triptolide could exert its anticancer activity through p38-mediated inhibition of tRXR-dependent AKT signaling. Identification of the new molecular mechanism for triptolide action will be helpful for modification and optimization of the lead compound for improving its anticancer selectivity and reducing its non-specific toxicity.

**Key words:** Triptolide; tRXR $\alpha$ ; apoptosis

## 第一章 前言

### 1. 核受体简介

核受体 (Nuclear Receptors, NRs) 超家族是真核细胞生物体内分布最广泛的一大类功能蛋白, 由48个基因编码的200多个蛋白质组成<sup>[1]</sup>。它可被类固醇、维生素A和甲状腺激素等脂溶性小分子调节, 调控细胞生长、增殖、分化、代谢、免疫反应和凋亡等几乎所有的生物学过程<sup>[2-9]</sup>。其成员众多, 构成了一个大家族, 根据其天然配体的不同, 又可分为三大类: 第一类是类固醇激素受体, 包括雄激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 和盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 等; 第二类是非类固醇激素受体: 如甲状腺激素受体 (Thyroid hormone Receptors, TR)、维甲酸受体 (Retinoic Acid Receptor, RAR、Retinoid X Receptor, RXR) 和维生素D3的受体 (Vitamin D3 Receptor, VDR) 等; 第三类是孤儿受体 (orphan nuclear hormone receptors)<sup>[9]</sup>, 未发现天然配体的受体, 如Nur77、COUP - TF等。

核受体具有相似的分子结构<sup>[10-12]</sup>, 一般分为六个区, 即 A、B、C、D、E 和 F 区<sup>[13-15]</sup>。A/B 区的长度不一, 由 50 至 500 个氨基酸组成。C 区为高度保守的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD), DBD 区包含两个高度保守的锌指结构。在 DNA 结合区 (C 区) 和配体结合区 (E 区) 之间有一较短且不保守的结构称为铰链区 (D 区), 该区含有核定位信号肽 (NLS)<sup>[16]</sup>。E 区, 即配体结合区 (ligand-binding domain, LBD), 是最大的结构域, 其序列高度保守, 以保证选择型配体的识别。E 区的二级结构是由 12 个  $\alpha$  螺旋组成, 核受体的配体结合区在 E 区。有些核受体还包含一个 F 区, 在 E 区的 C 端外, F 区的序列高度可变, 其结构和功能尚不十分清楚<sup>[17]</sup>。此外, 在 A/B 区域和 E 区域各包含一个转录激活功能域 (activation function, AF) 分别称为 AF-1 和 AF-2, 它们主要负责转录起始相关蛋白的招募<sup>[18]</sup>。

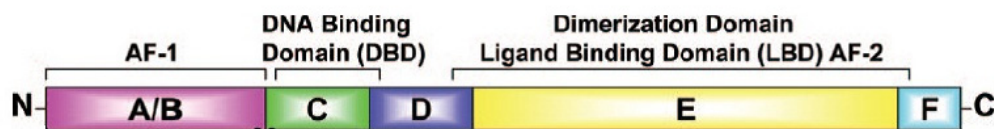


图 1 核受体结构示意图

DBD: DNA 结合结构域 ; LBD: 配体结合结构域

Fig.1 Structure of nuclear receptors

## 2. 视黄醇 X 受体

视黄醇 X 受体 (Retinoid X Receptor, RXR) 属于非类固醇激素受体超家族, 是核受体家族中一个具有多种生物学功能的独特成员, 介导着许多激素、维生素 A 和其它药物的生物学功能。RXR 参与了机体从胚胎发育到器官形成, 以及成体各种新陈代谢的生理调控等众多过程。近年来还发现, RXR 在不同配体调控下可以进行核浆穿梭, 执行不同的生物学功能, 如细胞凋亡, 增殖和分化等<sup>[19-22]</sup>。

### 2.1 视黄醇 X 受体的结构

视黄酸受体 (RAR) 鉴定出来后, 另一被命名为视黄醇 X 受体 (RXR) 也被发现。二者共同介导视黄酸或视黄醇的信号转导<sup>[23]</sup>。事实上, RAR 与甲状腺激素受体 (TR) 的相似程度大于 RXR, 提示这两个维甲酸受体涉及不同的信号通路的调节, 不仅仅是重复维甲酸的信号通路。

由于利用的启动子和剪切方式的不同,<sup>[24-27]</sup> RAR 和 RXR 各包括三种亚型<sup>[28, 29]</sup>。上述三个亚型的表达部位有很大不同。RXR $\alpha$  在肝、肾、脾、胎盘、表皮和各种内脏组织表达丰富; RXR $\beta$  表达广泛, 几乎在每一种组织都可以发现; RXR $\gamma$  主要局限在肌肉和脑组织中表达。其他一些关于分化和代谢过程的研究提示, RXRs 在发育过程中作用广泛且重要, 从胚胎植入到器官发生, 以及成人生理和代谢过程的调节。RAR 和 RXR 新亚型及靶基因的不断发现, 使该受体子家族成为胚胎发育和肿瘤学研究的焦点。

在根据序列同源性对核受体进行分类时, RAR 与 VDR、TR、PPAR 同属一类, 而 RXR 与 COUP-TF、HNF-4 同属最为古老的一类<sup>[38]</sup>。最近, 从海绵 *Suberites domuncula* 中也发现了 RXR 的类似物, 因此 RXR 的类似物可能是最古老的核受体, 很多核受体由它进化而来<sup>[39]</sup>。这就意味着 RXR 及其类似物在许多生物机体内可能发挥着比其他核受体更为重要的作用。

## 2.2 视黄醇 X 受体的基因型功能

RARs 可以被 ATRA 和 9-cis RA 激活, 而 RXRs 只能被 9-cis RA 激活<sup>[30,31]</sup>。能够特异性激活 RXR 的天然和合成化合物叫做“rexinoids<sup>[32]</sup>”。RXR 在核受体中是独一无二的, RXRs 可以形成同二聚体, 也可以与其他受体如: RAR、VDR (维生素 D 受体)、PPAR (过氧化物增殖因子激活受体)、TR (甲状腺素受体)、及一些孤儿核受体如 LXR (肝 X 受体)、PXR (孕烷 X 受体)、CAR (持续性激活受体) 和 TR3 (也称 Nur77 和 NGFI-B) 形成异二聚体<sup>[33-35]</sup>。在 RXRs 参与形成的异源二聚体中, RXR 有的是沉默的, 仅是一个伴侣, 配体并不能激活它, 但在 RAR/RXR 和 RXR/TR3 中, 配体则起着活化作用。由于 RXR 能与多种受体及蛋白结合, 所以它在机体中发挥着重要作用, 至少是 11 条信号通路传递的参与者, 而 RAR 则仅仅以 RAR/RXR 的形式参与对靶基因的转录调控<sup>[27]</sup>。

RXR 自身还可以形成同源二聚体。配体调控视黄素类受体功能的过程相当复杂<sup>[107]</sup>, RXR 同其配体的结合是其形成同源二聚体或与其它核受体形成异源二聚体的前提, 如 TR3 / RXR 和 PPAR $\gamma$  / RXR。没有结合配体的视黄醇 X 受体在基因转录中起负调控作用。它通过结合到其靶基因的视黄酸应答元件 (RAREs) 上, 募集受体辅抑制因子如 NcoR, 抑制组蛋白乙酰化, 形成结构上没有活性的染色体, 阻止转录的启动。配体的结合则诱导视黄醇 X 受体的构像发生改变, 使其释放受体辅抑制因子并募集受体辅激活因子如 CBP。许多辅激活因子具有组蛋白乙酰化转移酶活性, 可以通过乙酰化作用使染色体形成有活性的结构, 从而激活靶基因的转录<sup>[108]</sup>。

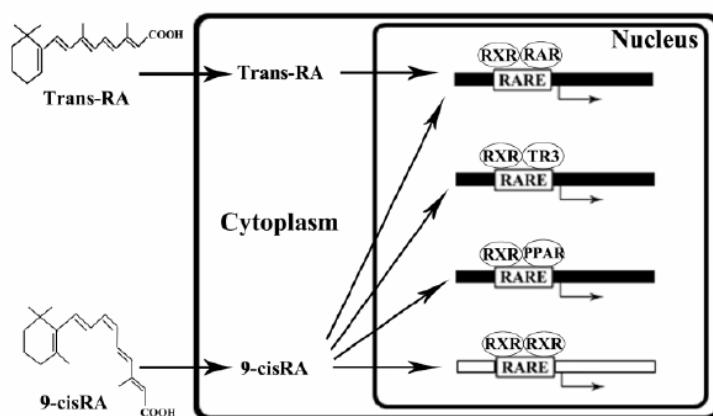


图 2 视黄醇 X 受体的基因型功能<sup>[108]</sup>

Fig 2 The nongenomic action of RXR

### 2.3 视黄醇 X 受体的非基因型功能

核受体的基因型功能是传统而经典的,主要是通过核受体与 DNA 上相应元件的直接相互作用来调节靶基因的表达,还能通过与一些转录因子之间相互作用,而不通过直接与 DNA 结合来调节基因的表达。然而,近十多年来根据核受体的基因型功能进行药物开发并未能取得突破性的进展,说明我们对核受体的作用机制的认识有待于进一步创新。最近十年来,人们逐渐认识到,核受体能发挥如此广泛生物学功能的重要原因之一,是它能够定位到细胞内不同的亚细胞结构上,通过与不同蛋白之间的直接相互作用,快速调控细胞内信号转导通路。人们发现,一些视黄素快速激活的反应,例如 GTPase Rac<sup>[40]</sup>、PKC<sup>[40]</sup>、ERK2<sup>[41]</sup>、CREB<sup>[42,43]</sup> (cAMP-response element-binding protein) 和磷酸肌醇-3 激酶这种作用方式被称为核受体的“非基因型功能”(Non – Genomic Action),也称为“非转录依赖性功能”<sup>[44]</sup>。“非基因型功能”的发现,为核受体研究开创了崭新的领域,目前认为,核受体的非基因型作用主要发生在细胞质或细胞膜内侧,核受体与细胞质内信号转导通路的某些关键蛋白之间发生直接相互作用,形成一种新的信号转导复合物,该复合物可同时接受来自核受体特异性的小分子配体和膜受体信号通路的双重调控。

目前,核受体的这种非基因型信号转导调控机制已被广泛认为是维持细胞的正常生理功能所必需的。这种作用机制在细胞的病理过程中有可能比经典的核内靶基因转录调控机制更重要。因而,研究核受体的非基因型信号转导调控机制对我们认识细胞的病理过程中的调控及开发新型的调节各种病理过程的治疗药物具有重要意义。

在某些细胞和发育的不同时期,RXR $\alpha$  定位于细胞质。RXR $\alpha$  从细胞核向细胞质的转位应答于分化、凋亡和炎症。细胞质定位的核受体不仅仅通过调节细胞核中的蛋白量来调节转录,同时也在与其它信号通路的交互作用中发挥功能。

核受体的非基因型功能受多种因素调节。在许多信号通路中,外界刺激可能导致蛋白水解切割。核受体蛋白普遍存在限制性水解并生成截短蛋白的现象,这些截短蛋白在细胞内各个功能区域穿梭,参与细胞功能调控。如雄激素受体被钙蛋白酶水解后产生的截短蛋白对配体不敏感,可能与不依赖于雄激素的前列腺癌发生有关<sup>[45]</sup>。最近的研究表明肿瘤细胞中 RXR $\alpha$  表达水平的降低主要是由于它的水解切割<sup>[46]</sup>。已有证据表明,组织蛋白酶 L 和钙蛋白酶具有切割 RXR $\alpha$  的

功能。组织蛋白酶 L 属于溶酶体组织蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶亚类，这类蛋白酶主要作用是降解溶酶体蛋白。此外，有研究发现组织蛋白酶 L 存在于细胞核内，由此引发了对溶酶体组织蛋白酶在溶酶体外作用的研究。深入研究发现这类酶可以在生理和病理过程中发挥作用。钙蛋白酶是可以被二价钙离子激活的蛋白酶大家族，它通过限制性水解特异的靶蛋白对细胞粘附、细胞迁移和细胞死亡过程进行调控<sup>[47]</sup>。RXR  $\alpha$  的限制性水解主要发生在 N-端，同 DNA 结合结构域和配体结合结构域相比，N-端 A/B 结构域的功能和调控至今仍不清楚。事实上，核受体 N-端 A/B 结构域是高度可变的，说明他们可能介导多种生物学作用。对转基因表达 N-端 A/B 结构域缺失的 RXR  $\alpha$  的小鼠进行表型分析，发现 RXR  $\alpha$  的 AF-1 结构域对于胚胎发育过程中类维生素 A 信号转导具有重要作用。N-端 A/B 结构域的特征是它具有许多磷酸化位点，是诸如 JNK 在内的许多激酶的靶点。RXR  $\alpha$  被 MAPK 高度磷酸化同某些肝细胞癌无限生长有关。然而，通过 N-端 A/B 结构域和其磷酸化位点调控 RXR  $\alpha$  的活性的机制仍不清楚<sup>[48]</sup>。

综上所述，核受体的非基因型功能研究虽然已取得突破性的进展，但不能否认的是对其分子机制和功能的研究仍处于初步阶段。核受体的非基因型功能在肿瘤等人类重大疾病的发生、发展中发挥重要作用，所以清楚的认识核受体非基因型功能及其调控机制，有助于我们阐明病理条件下的信号传导，为寻找、开发新型药物提供新的思路 and 理论依据。

## 2.4 视黄醇 X 受体与肿瘤

由于 RXR 参与许多核受体以及生长和凋亡信号转导通路中关键信号分子的功能调控，该基因被认为是核受体超家族中最有开发前景的重要成员。随着细胞信号转导研究的深入，人们对维甲类核受体分子作用机制有了更全面的了解。既往的观点认为，维甲类核受体的生物学作用主要是由于调控特定靶基因的转录，如视黄醇（Retinoid）通过 RARE 可上调 RAR $\beta$ 、p21 和 RB 表达，抑制 TGF $\alpha$  的表达<sup>[49,50]</sup>等。基于这样的理解，许多开发的视黄醇类药物主要利用其对靶基因转录调控的影响，诱导细胞分化。目前，对 RAR 的靶基因了解多一些，但 RXR 的靶基因至今仍未完全确定，提示 RXR 的生物学作用可能主要不是由位于核内通过调控它的异源双链活性作用于靶基因的转录所介导。遗传学研究进一步表明<sup>[51]</sup>，RXR<sup>-/-</sup>/RXR<sup>-/-</sup>缺失突变会发生发育障碍，但表达仅缺失 AF2 结构域的



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库